Zastosowanie metody spektrofotometrii i densytometrii do oceny widm naproksenu w zakresie UV-VIS

Alina Pyka-Pająk^{1,2}, Wioletta Parys¹, Małgorzata Dołowy¹

¹ Zakład Chemii Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

² Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Adres do korespondencji: Alina Pyka-Pająk, Zakład Chemii Analitycznej, Katedra Chemii Ogólnej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, ul. Jagiellońska 4, 41-200 Sosnowiec, e-mail: apyka@sum.edu.pl

Application of spectrophotometry and densitometry to spectra evaluation of naproxen in UV-VIS range

The aim of this work was to compare naproxen spectra obtained by spectrodensitometric method on different chromatographic sorbents to high performance thin-layer chromatography with naproxen spectra obtained using spectrophotometric method.

It was stated that stationary phase applied in thin-layer chromatography affects length of the basic band as well as additional naproxen absorption bands and their intensity determined by spectrodensitometric method. These spectra have five or four absorption bands. The spectra obtained using spectrophotometric method have five absorption bands.

Comparison of absorption spectra on various chromatographic sorbents obtained by spectrodensitometric method with spectrophotometric analysis extends the possibility of identification test of naproxen.

Keywords: naproxen, HP-TLC, spectrodensitometry, spectrophotometry, identification.

© Farm Pol, 2018, 74 (11): 636–640

Wstęp

Strukturę oraz czystość związków organicznych, w tym farmaceutyków ustala się stosując różne metody spektroskopowe, w tym głównie spektroskopię w podczerwieni (*Infrared*, IR) oraz spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR). Oprócz tych nowoczesnych technik analitycznych cennym

narzędziem stosowanym pomocniczo w analizie jakościowej leków, tzn. do badania ich tożsamości, jest jedna z najstarszych metod analitycznych, tj. spektroskopia w ultrafiolecie i w świetle widzialnym (*Ultra Violet*, *VISible*) czyli UV-VIS [1–3]. Warunkiem niezbędnym do stosowania spektrofotometrii UV-VIS jest obecność odpowiednich ugrupowań tzw. chromoforów w cząsteczce badanego związku. W związku z tym spektroskopia ta pozwala łatwo zidentyfikować związki zawierające sprzężone układy wiązań wielokrotnych oraz związki aromatyczne. Do celów potwierdzenia identyczności danego związku oraz wyznaczania struktury różnych związków organicznych techniką spektrofotometrii UV-VIS wykorzystywane są elektronowe widma absorpcyjne tych połączeń. W praktyce w badaniach strukturalnych związków organicznych widma badanych substancji porównywane są z widmami substancji o znanej strukturze. W celu poprawnej identyfikacji badanego związku, niewystarczające jest tylko porównanie położenia i natężenia maksimów pasm absorpcyjnych ($\lambda_{\max}$), konieczne jest porównanie całej krzywej absorpcji, ponieważ tylko pełna zgodność całego widma świadczy o identyczności badanych substancji [1].

W naszych wcześniejszych badaniach zastosowaliśmy densytometrię i spektrodensytometrię do porównania spektrodensytogramów witamin lipofilnych na różnych nośnikach chromatograficznych [4, 5]. Prace te wykazały wpływ warunków chromatograficznych na ukształtowanie się

spektrodensytogramów badanych substancji. Podobnie w innych pracach wykazaliśmy również, że porównanie widm wzorca danej substancji i jej odpowiednika występującego w leku może być podstawą badań jego tożsamości [6, 7].

Do uprzednio przebadanych przez nas substancji o różnym działaniu farmakologicznym należy także naproksen. To kwas 2-(6-metoksynaft-2-yl)-propionowy (**rycina 1**). Jest to substancja o wzorze sumarycznym $C_{14}H_{14}O_3$ i masie molowej 230,259 g/mol, stosowana w postaci kwasu lub jego soli sodowej jako niesteroidowy lek przeciwzapalny (NLPZ). Wykazuje on działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe oraz przeciwgorączkowe [8, 9].

We wcześniejszej naszej pracy opisaliśmy zastosowanie metody spektrofotometrii [10] oraz metody TLC w połączeniu z densytometrią do oznaczania naproksenu w preparatach farmaceutycznych [11].

Zasadniczym celem niniejszej pracy było porównanie widm naproksenu uzyskanych metodą spektrodensytometryczną, na różnych nośnikach chromatograficznych, do wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HP-TLC), z widmem naproksenu otrzymanym za pomocą klasycznej metody spektrofotometrycznej w zakresie UV-VIS.

Materiał i metody

Wykonanie badań techniką HP-TLC

Stosowane fazy stacjonarne

W badaniach zastosowano fazy stacjonarne do: podziałowej wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (RP-HP-TLC), mianowicie RP2F_{254s} (#1.13726, E. Merck), RP8F_{254s} (#1.13725, E. Merck), RP18F_{254s} ze strefą koncentracji (#1.15498, E. Merck), RP18WF_{254s} (#1.13124, E. Merck), RP18 (#1.05914, E. Merck), RP18W (#1.14296, E. Merck), CNF_{254s} (#1.12571, E. Merck), oraz adsorpcyjnej wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (NP-HP-TLC), tj. DiolF_{254s} (#1.05636, E. Merck), NH₂F_{254s} (#1.13192, E. Merck) i żel krzemionkowy 60F_{254s} (#1.05649, E. Merck).

Przygotowanie roztworu wzorcowego naproksenu do badań techniką HP-TLC

Roztwór został przygotowany o stężeniu 1 mg naproksenu w 1 ml etanolu absolutnego. Niniejszy roztwór наносzono na płytki chromatograficzne każdorazowo w ilości 5 µl, przy pomocy kalibrowanej mikrokapilary firmy Camag (Szwajcaria).

Warunki badań techniką HP-TLC

Stosowane w badaniach płytki chromatograficzne Diol F_{254s} i NH₂ F_{254s} z nakropionym

Rycina 1. Wzór strukturalny naproksenu

naproksenem rozwijano przy użyciu fazy ruchomej n-heksan + eter dietylowy + kwas octowy (80%) w stosunku objętościowym 7,4:2,2:0,3. Płytki pokryte żel krzemionkowy 60F₂₅₄ z nakropionym naproksenem rozwijano przy użyciu fazy ruchomej n-heksan + eter dietylowy + kwas octowy (80%) w stosunku objętościowym 7:2:1. Pozostałe płytki chromatograficzne z nakropionym naproksenem rozwijano przy użyciu fazy ruchomej metanol + woda w stosunku objętościowym 7:3. Płytki rozwijano do wysokości 7,5 cm w klasycznej komorze chromatograficznej firmy Camag, w temperaturze pokojowej (22 ± 1 °C). Komory chromatograficzne przed włożeniem płytek z naniesionymi związkami, nasycano parami faz ruchomych (50 ml) przez 15 minut. Chromatogramy po rozwinięciu osuszano na powietrzu.

Wizualizacja naproksenu za pomocą densytometru

Skanowanie densytometryczne przeprowadzono za pomocą densytometru firmy Camag TLC 3 oraz oprogramowania winCATS 1.4.2. Skanowanie przeprowadzano przy długości fali równej 254 nm. Źródłem promieniowania była lampa deuterowa. Rozmiar szczeliny wynosił 8,00 × 0,40 mm, Macro; szybkość skanowania 20 mm/s; rozdzielczość 100 mm/krok. Pomiar pasm chromatograficznych przeprowadzono poprzez absorpcję promieniowania UV.

Analiza spektrodensytometryczna naproksenu

Analiza spektrodensytometryczna była przeprowadzona za pomocą densytometru firmy Camag TLC 3. Źródłem promieniowania była lampa deuterowa. Analiza spektrodensytometryczna przeprowadzona była w zakresie długości fal od 200 do 400 nm. Rozmiar szczeliny wynosił 8,00 × 0,40 mm, Macro; szybkość skanowania 20 nm/s; rozdzielczość 1 nm/krok. Pomiar następował w trybie absorpcji.

Tabela 1. Wartości R_f i charakterystyka spektrodensytogramów naproksenu analizowanego na różnych nośnikach chromatograficznych techniką HP-TLC

Płytki chromatograficzne	Wartości R_f	Długość podstawowego pasma absorpcji λ_{max} [nm]	Dodatkowe pasma absorpcji	
			λ [nm]	Intensywność [AU]
RP2F _{254s} ^{a)}	0,53	233	266	34,6
			274	36,2
			320	26,5
			331	29,8
RP8F _{254s} ^{a)}	0,26	235	264	42,7
			274	45,0
			320	38,4
			330	42,0
RP18F _{254s} ze strefą koncentracji ^{a)}	0,42	235	275	50,4
			320	45,2
			330	50,1
RP18WF _{254s} ^{a)}	0,41	231	265	35,6
			273	36,8
			318	23,6
			329	26,6
RP18 ^{a)}	0,23	237	266	58,8
			275	61,9
			320	50,1
			330	54,0
RP18W ^{a)}	0,43	232	265	45,6
			273	47,7
			318	24,5
			329	27,1
CNF _{254s} ^{a)}	0,45	238	265	65,0
			274	68,1
			321	50,7
			332	56,4
DiolF _{254s} ^{b)}	0,22	230	266	33,7
			272	34,7
			319	20,9
			330	23,3
NH ₂ F _{254s} ^{b)}	0,10	232	265	63,6
			271	64,9
			320	46,5
			332	51,3
Żel krzemionkowy 60F _{254s} ^{c)}	0,30	229	262	36,3
			272	39,0
			318	21,1
			330	23,3

a) faza ruchoma: metanol + woda, 70:30 (v/v)

b) faza ruchoma: n-heksan + eter dietylowy + kwas octowy (80%), 7,4:2,2:0,3 (v/v/v)

c) faza ruchoma: n-heksan + eter dietylowy + kwas octowy (80%), 7:2:1 (v/v/v)

Warunki badań naproksenu techniką spektrofotometryczną

Przygotowano roztwory metanolowe naproksenu o stężeniu: 0,08 mg/ml; 0,04 mg/ml oraz 0,02 mg/ml.

Analizę spektrofotometryczną przeprowadzono za pomocą spektrofotometru Specord 205 firmy AnalytikJena oraz oprogramowania WinASPECT. Analiza spektrofotometryczna przeprowadzona była w zakresie długości fal od 200 do 400 nm. Pomiary przeprowadzono w następujących warunkach: tryb – absorbancja, korekcja – standardowa, czas integracji – 0,2s, $\Delta\lambda$ – 0,1 nm, kuweta – kwarcowa o $l=1$ cm.

Wyniki

W tabeli 1 zaprezentowano wartości R_f oraz charakterystykę spektrodensytogramów naproksenu analizowanego na poszczególnych płytkach chromatograficznych techniką HP-TLC. Wszystkie przedstawione wyniki uzyskane techniką TLC są średnimi z siedmiu pomiarów.

Rycina 2 ilustruje przykładowe wyniki analizy spektrofotometrycznej roztworu naproksenu o stężeniu 0,04 mg/ml.

Na rycinie 3 i 4 zobrazowano przykładowe spektrodensytogramy naproksenu badanego na płytkach chromatograficznych pokrytych żelem krzemionkowym 60F₂₅₄ (rycina 3) oraz na płytkach RP18 odpowiednio (rycina 4).

Natomiast w tabeli 2 przedstawiono ogólne porównanie widm naproksenu uzyskanych metodą spektrodensytometryczną i spektrofotometryczną.

Omówienie wyników

Zasadniczym celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu różnych faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii cienkowarstwowej na maksimum absorpcji, tj. λ_{max} naproksenu analizowanego metodą spektrodensytometryczną. Jako fazy stacjonarne zastosowano płytki chromatograficzne: RP2F_{254s}, RP8F_{254s}, RP18F_{254s} ze strefą koncentracji, RP18WF_{254s}, RP18, RP18W, CNF_{254s}, DiolF_{254s}, NH₂F_{254s} oraz żel krzemionkowy 60F_{254s}.

Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione w tabeli 1. Prezentują one wartości R_f naproksenu, długość fali λ [nm] dla pasma podstawowego i pasm dodatkowych oraz odpowiadającą im intensywność (I) wyrażoną w jednostkach arbitralnych [AU]. Należy zauważyć, że zarówno λ_{max} podstawowego pasma absorpcji oraz λ dodatkowych pasm absorpcji

Rycina 2. Widmo naproksenu o stężeniu 0,04 mg w 1 ml metanolu otrzymane metodą spektrofotometryczną

i ich intensywności w zakresie promieniowania UV dla naproksenu, wykazują pewne różnice w wartościach liczbowych obejmujących długości fali, również liczbę pasm absorpcyjnych. Na wszystkich nośnikach chromatograficznych, za wyjątkiem RP18F_{254s} ze strefą koncentracji, naproksen posiada 5 pasm absorpcyjnych. Na RP18F_{254s} ze strefą koncentracji posiada 4 pasma absorpcyjne. Analizując wartości liczbowe $\lambda_{\max}$ oraz liczbę dodatkowych pasm absorpcyjnych, oraz ich długość fali i intensywność, należy stwierdzić, że rodzaj fazy stacjonarnej wpływa na omawiane parametry fizykochemiczne, które posiadają określone znaczenie analityczno-identyfikacyjne. Szczególnie ten zróżnicowany wpływ uwidacznia się dla następujących faz stacjonarnych: żel krzemionkowy 60F_{254s} ($\lambda_{\max}$ = 229 nm), RP18 ($\lambda_{\max}$ = 237 nm) i RP2 F_{254s} ($\lambda_{\max}$ = 233 nm).

Uzyskane wyniki wskazują nie tylko na problem standaryzacji warunków badań naproksenu w omawianym zakresie długości fali, ale stanowią obszar dodatkowej możliwości identyfikacyjnej naproksenu na dwóch lub trzech nośnikach, tj. fazach stacjonarnych. Powyższy fakt niewątpliwie rozszerza możliwości badań identyfikacyjnych również dla innych leków.

W dalszej części pracy wykonano widma naproksenu metodą spektrofotometryczną w zakresie od 200 nm do 400 nm. Analizy wykonano dla trzech stężeń: 0,02 mg/ml; 0,04 mg/ml oraz 0,08 mg/ml. Widma te posiadają pięć pasm absorpcyjnych. Pierwsze pasmo absorpcji jest rozciągnięte. Dla stężenia naproksenu 0,02 mg/ml występuje ono w zakresie od 218,6 nm do 236,7 nm, dla stężenia 0,04 mg/ml widoczne jest w zakresie od 215,2 nm do 239,1 nm natomiast dla stężenia 0,08 mg/ml położone jest w zakresie od 214,6 nm do 242,0 nm. Pozostałe cztery pasma absorpcji występują przy następujących długościach fali równych około: 262 nm, 272 nm, 317 nm oraz 331 nm. Warto podkreślić, że intensywność tych pasm absorpcji maleje ze stężeniem analizowanej próbki. Wyniki analizy widmowej (spektrofotometrii UV-VIS) uzyskane dla roztworu naproksenu o stężeniu 0,04 mg/ml są zgodne z danymi zamieszczonymi w Farmakopei Polskiej VIII [8], ponieważ w maksimach absorpcji 262,3 nm, 271,9 nm, 317,2 nm oraz 331,5 nm absorbancje właściwe wynoszą odpowiednio: 228, 230, 65 oraz 83.

Ogólne porównanie widm naproksenu uzyskanych metodą spektrodensytometryczną oraz metodą spektrofotometryczną przedstawiono w tabeli 2. Należy stwierdzić, iż widma naproksenu uzyskane metodą spektrodensytometryczną posiadają podstawowe pasmo absorpcji zwarte, w zależności od nośnika wartość $\lambda_{\max}$ mieści się w granicach od 229 do 238 nm. Widmo podstawowe naproksenu uzyskane metodą spektrofotometryczną jest rozciągnięte. Natomiast dodatkowe pasma absorpcji

Rycina 3. Spektrodensytogram naproksenu analizowanego na płytce chromatograficznej pokrytej żel krzemionkowym 60F₂₅₄

Rycina 4. Spektrodensytogram naproksenu analizowanego na płytce chromatograficznej pokrytej żel krzemionkowym RP18

naproksenu uzyskane metodą spektrodensytometryczną występują przy podobnych długościach fali jak dodatkowe pasma absorpcji widm naproksenu uzyskane metodą spektrofotometryczną.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że faza stacjonarna zastosowana w chromatografii cienkowarstwowej wpływa na długość

Tabela 2. Ogólne porównanie widm naproksenu uzyskanych metodą spektrodensytometryczną i spektrofotometryczną

Widmo wykonane metodą:	Długość podstawowego pasma absorpcji $\lambda_{\max}$ [nm]	Dodatkowe pasma absorpcji λ [nm]
spektrodensytometryczną na różnych płytkach chromatograficznych	229–238 (pasmo dobrze wykształcone – zwarte)	262–266 272–275 318–321 329–331
spektrofotometryczną próbek o trzech stężeniach naproksenu	214,6–242,0 (pasmo rozciągnięte)	262,3–262,6 271,9–272,1 317,2–317,3 331,5–331,6

pasma podstawowego i dodatkowych pasm absorpcji naproksenu, jak również ich intensywność, wyznaczonych metodą spektrodensytometryczną. Rezultaty badań naproksenu techniką wysoko-sprawnej chromatografii cienkowarstwowej w połączeniu z densytometrią świadczą o tym, że porównywanie widma naproksenu uzyskanego na różnych nośnikach chromatograficznych metodą spektrodensytometryczną w połączeniu z analizą widmową przeprowadzoną przy użyciu techniki spektrofotometrycznej UV-VIS znacznie zwiększa możliwości badań identyfikacyjnych naproksenu, w tym również do celów potwierdzenia jego tożsamości, co może mieć w przyszłości zastosowanie w kontroli jakości preparatów farmaceutycznych, zawierających w swoim składzie tę substancję.

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach w ramach badań statutowych KNW-1-057/K/8/O.

Otrzymano: 2018.11.19 · Zaakceptowano: 2018.12.10

Piśmiennictwo

1. Kazicyna L.A., Kupletska N.B.: Metody spektroskopowe wyznaczania struktur związków organicznych. Warszawa, PWN, 1976.
2. Zieliński W., Rajca A. (red): Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych. WNT, Warszawa 2000.
3. Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.J.: Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych. Warszawa, PWN, 2007.
4. Pyka A., Babuška M., Dziadek A., Gurak D.: Comparison of spectrodensitograms of the selected drugs on different chromatographic sorbents. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol* 2007, 30 (9&10): 1385–1400.
5. Pyka A.: Vitamins, Hydrophobic: TLC analysis. W: Cazes J. Encyclopedia of chromatography, 3rd ed.; Boca Raton: Taylor and Francis: 2010, 2415–2425.
6. Pyka A., Bocheńska P.: Comparison of NP-TLC and RP-TLC with densitometry to quantitative analysis of ibuprofen in pharmaceutical preparation. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol* 2010, 33 (6): 825–836.
7. Pyka A., Bober K., Stolarczyk A.: Densitometric determination of arbutin in cowberry leaves (*Vaccinium vitis idaeae*). *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.* 2007, 64(5): 395–400.
8. Farmakopea Polska VIII. Warszawa, PTFarm 2008.
9. Janiec W. (red.): Kompendium farmakologii. Warszawa, PZWL, 2016.
10. Pyka A., Nieduziak A.: Zastosowanie metody spektrofotometrii do oznaczania naproksenu w preparatach farmaceutycznych. *Farm. Pol.* 2010, 66(10): 673–676.
11. Pyka A., Wiatr E., Kwiska K., Gurak D.: Validation thin layer chromatography for the determination of naproxen in tablets and comparison with a pharmacopeil method. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* 2011, 34(10/11): 829–847.